

· 论 著 ·

## 3 种不同类型基因导入系统转染类神经元细胞的效率比较\*

梁 兵<sup>1</sup>, 袁 芳<sup>1</sup>, 杨 宁<sup>2</sup>, 殷建瑞<sup>1</sup>, 蒲蜀湘<sup>1</sup>, 解龙昌<sup>1</sup>, 高庆春<sup>1</sup>, 高 聪<sup>1△</sup>

(1. 广州医学院第二附属医院神经科学研究所/神经内科, 广州 510260;

2. 广州医学院第五附属医院神经内科, 广州 510700)

**摘要:**目的 应用 3 种不同类型基因导入系统携带能表达绿色荧光蛋白的 pAAV-EGFP 质粒转染两类神经元细胞株, 并对细胞毒性和转染效果进行比较。方法 LipofectAMINE 2000、聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI, 相对分子质量为  $25 \times 10^3$ ) 及该课题组合成的 PEI-聚乙二醇 (polyethyleneglycol, PEG) 4.6 在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞和 C6 胶质瘤细胞中的转染效果, 通过 MTT 法检测细胞存活率, 倒置显微镜荧光观察法和流式细胞仪法检测转染效果。结果 MTT 检测发现, 在 C6 胶质瘤细胞中, PEG-PEI 4.6 的细胞存活率为 83%, 比 PEI (70%) 和 LipofectAMINE 2000 (73%) 的细胞存活率要高 ( $P < 0.05$ ); 但 LipofectAMINE 2000 和 PEI 的细胞存活率比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中的检测结果与 C6 胶质瘤细胞类似。倒置显微镜观察发现, 在 C6 胶质瘤细胞中, PEG-PEI 4.6 的细胞荧光表达效果比 LipofectAMINE2000 和 PEI 要好; 而在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中, LipofectAMINE 2000 的荧光表达效果比另外两种复合物的效果好, 同时 PEG-PEI 4.6 的荧光表达效果比 PEI 要好。流式细胞仪检测发现在 C6 胶质瘤细胞中, PEG-PEI 4.6 的转染效率最好, 为 23.2%; LipofectAMINE2000 其次, 为 16.9%; PEI 最差, 为 12.6%, 三者两两比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中则是 LipofectAMINE 2000 的转染效率最好, PEG-PEI 4.6 其次, PEI 最差, 转染效率分别为 22.3%、17.2%、10.6%, 三者两两比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 LipofectAMINE 2000 和 PEG-PEI 4.6 都可作为目前神经系统基因转染的传输载体。

**关键词:** 神经胶质瘤; 神经母细胞瘤; 脂质体; 转染

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.18.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)18-1792-03

**The comparison of the transfection efficiency of three different types of gene expression system in the neurotypic cell lines\***Liang Bing<sup>1</sup>, Yuan Fang<sup>1</sup>, Yang Ning<sup>2</sup>, Yin Jianrui<sup>1</sup>, Pu Shuziang<sup>1</sup>, Xie Longchang<sup>1</sup>, Gao Qingchun<sup>1</sup>, Gao Cong<sup>1△</sup>

(1. Institute of Neuroscience/Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China; 2. Department of Neurology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510700, China)

**Abstract: Objective** Use three different types of gene expression system carry the pAAV-EGFP plasmid can express green fluorescent protein to transfect the neurotypic cell lines and to compare their cell toxicity and their transfection effects. **Methods** We used the commercial liposomes and nanoparticles such as the LipofectAMINE 2000, the PEI ( $25 \times 10^3$ ) and PEG-PEI 4.6 as the gene expression system, carry the pAAV-EGFP plasmid to transfect the commonly used neurotypic cells in nervous system cells such as the SH-SY5Y neuroblastoma cells and C6 glioma cells. Then we detected the cell toxicity through the MTT method, and detected the transfection effects by the inverted microscope fluorescent observation and the flow cytometric method. **Results** MTT detection results showed the cell survival rate of PEG-PEI 4.6 (83%) was higher than PEI (70%) and LipofectAMINE 2000 (73%) in the C6 glioma cells ( $P < 0.05$ ), but the compare of the cell survival rate of PEI and LipofectAMINE 2000 had no statistical significance ( $P > 0.05$ ); The similar results were in the SH-SY5Y neuroblastoma cells. The inverted microscope fluorescent observed in C6 glioma cells the PEG-PEI 4.6 had higher fluorescence expression than LipofectAMINE2000 and PEI. While in SH-SY5Y neuroblastoma cells, the LipofectAMINE2000 had higher fluorescence expression than other two materials. At the same time, the PEG-PEI 4.6 had higher fluorescence expression than PEI. The flow cytometric results showed in C6 glioma cells the PEG-PEI 4.6 had the best efficiency to 23.2%, LipofectAMINE2000 was next of 16.9%, the worst PEI was 12.6% ( $P < 0.05$ ); In SH-SY5Y neuroblastoma cells LipofectAMINE2000 had the best efficiency, PEG-PEI 4.6 second, and PEI was the worst ( $P < 0.05$ ), the efficiency of them was 22.3%, 17.2% and 10.6% respectively. **Conclusion** At present LipofectAMINE 2000 and PEG-PEI 4.6 can serve as the gene transfection carrier of the nervous system.

**Key words:** glioma; neuroblastoma; liposomes; transfection

目前应用于基因治疗研究的基因转移载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类<sup>[1]</sup>。常用的病毒载体, 虽经遗传工程改造, 去除了病原性而保留了基因转染效能, 但制备困难、目的

基因插入长度受限, 还存在潜在的免疫反应和生物安全等问题。非病毒载体大多制作简单、免疫原性低、不与宿主基因整合、可重复应用、克隆能力不受限, 而其中的脂质体和纳米载体

\* 基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81100890); 广东省自然科学基金资助项目 (10151018201000022); 广东省博士启动项目 (10451018201004383); 广州市属高校羊城学者科研项目 (10A010G); 广州医学院博士启动基金 (2008c46)。△ 通讯作者, E-mail: smilegaocong@163.com。

凭借其诸多优势,成为新型非病毒载体中研究的热点<sup>[2-3]</sup>。

阳离子类脂类载体的研究起步较早,一些体系已经进入临床试验阶段<sup>[4]</sup>,这类载体的一个主要缺点是在生理环境中具有尺寸多、分散性大,且易于聚集成大的颗粒而使细胞吸收效率降低;随着纳米技术的发展,纳米阳离子聚合物载体的稳定性更好,结构及性能也更容易调控,近年来成为基因传输研究中非常热门的领域<sup>[5]</sup>。

通常培养的神元细胞和原代的神经细胞很难转染,转染试剂对培养基和血清的敏感性以及细胞毒性经常导致低转染率、低细胞低存活率和神经退行性变化,进而导致实验进程受阻<sup>[6-7]</sup>。本研究比较了 LipofectAMINE 2000、聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI, 相对分子质量为  $25 \times 10^3$ ) 及本课题组应用过的 PEI-聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG) 4.6 在神经系统常用细胞——SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞和 C6 胶质瘤细胞中的转染效果,以筛选出适合神经系统常用细胞的基因治疗载体,为基因技术在神经系统常用细胞中的应用研究提供指导。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** LipofectAMINE 2000、DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;PEI 购自 BASF 公司;PEG 购自韩国湖南化工有限公司,制备成 PEI-PEG 4.6。胎牛血清购自 Hyclone 公司;余为国产分析纯试剂。

**1.2 细胞来源及培养** C6 胶质瘤细胞和 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞购自美国 ATCC 公司,由本实验室保存。用加有 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 抗生素(青霉素/链霉素)的 DMEM 培养基在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱 37 °C 中培养。

**1.3 质粒 DNA(pDNA)的制备** 本研究应用能表达绿色荧光蛋白的 pAAV-EGFP。质粒在大肠杆菌中扩增,然后用 QIAGEN 试剂盒提取纯化。得到的质粒通过紫外分光计在 260 和 280 nm 波长处检测其含量;在 1.0% 的琼脂糖凝胶上以 100 V 电压电泳 40 min,检测其完整性。检测合格的质粒保存于一 20 °C 备用。

**1.4 LipofectAMINE2000/pDNA 复合物的制备** 在 Eppendorf 管中,将 1 μg pDNA 稀释在 50 μL 不含 FBS 的 DMEM 中,振荡均匀,然后与 2 μL LipofectAMINE 2000 进行混合在室温下振荡 5 min 得到均匀复合物。

**1.5 PEI/pDNA 和 PEI-PEG 4.6/pDNA 复合物的制备** 在 Eppendorf 管中,将 1 μg pDNA 稀释在 50 μL 不含 FBS 的 DMEM 中,振荡均匀,按 N/P=15 把相应量的 PEI 或 PEI-PEG 4.6 加入到另外一管装有 50 μL 不含 FBS 的 DMEM 的 Eppendorf 管中,然后把两溶液在室温下振荡 5 min 得到均匀复合物。

**1.6 细胞毒性检测(MTT 法)** 两种细胞以每孔 6 000 个细胞接种在 96 孔板中;24 h 后每孔加入含有 150 ng pAAV-EGFP 的聚合物/pDNA 复合物的 150 μL 不含血清培养液进行转染,每个 N/P 浓度复制在 4 个孔中,48 h 之后加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL),继续培养 4 h,小心吸出孔内培养上层清液后,加入 100 μL 二甲基亚砜(DMSO),室温振荡 5 min 后,通过化学发光酶标仪测定在 570 nm 处的吸光值。

## 1.7 转染效果检测

**1.7.1 转染过程** 两种细胞以  $1 \times 10^5$  细胞每孔接种在 24 孔板上培养 24 h,待细胞丰度 70%,在转染前 4 h 移去培养基,先用等量(400 μL)DMEM(无血清)培养基清洗,再用等量(400 μL)DMEM(无血清)培养基替换。直接将 50 μL 复合物加

入每孔中,摇动培养板,轻轻混匀。在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 4~5 h,更换含血清和抗生素的培养基,培育 48 h。

**1.7.2 倒置荧光显微镜观测** 转染 48 h 后通过倒置荧光显微镜观测 pDNA 在两种细胞中的转染效果,观察绿色荧光蛋白信号,照片用 Nikon 荧光软件捕获。阳性细胞发出明亮的绿色荧光,而阴性细胞则无。

**1.7.3 流式细胞仪观测** 转染 48 h 后弃去上层培养液,细胞用 500 μL Hank's 平衡盐溶液悬浮,然后应用流式细胞仪 AriaTM 系统计数表达绿色荧光蛋白的细胞的百分比,每种细胞重复 3 次取平均值。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间两两比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞毒性检测结果** 所有的材料载体对 C6 胶质瘤细胞和 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞都有一定的细胞毒性。在 C6 胶质瘤细胞中,PEG-PEI 4.6 的细胞存活率为 83%,比 PEI(70%)和 LipofectAMINE 2000(73%)的细胞存活率要高( $P < 0.05$ );LipofectAMINE 2000 和 PEI 的细胞存活率比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中的检测结果与 C6 胶质瘤细胞类似。见图 1。

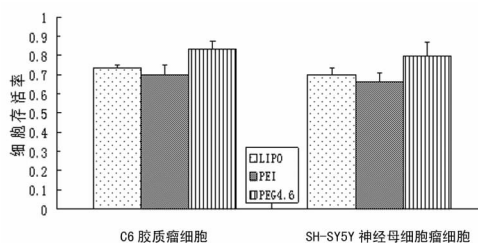


图 1 细胞毒性检测结果

**2.2 倒置荧光显微镜观测细胞转染效果** 为了直观检测各种载体的转染效果,载体与 pAAV-EGFP 复合后,在两种细胞中进行转染,然后分别用倒置荧光显微镜观测。在 C6 胶质瘤细胞中,PEG-PEI 4.6 的细胞荧光表达效果比 LipofectAMINE2000 和 PEI 要好,见图 2。而在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中,LipofectAMINE 2000 的荧光表达效果比另外两种复合物的效果好,同时在这种细胞中 PEG-PEI 4.6 的荧光表达效果比 PEI 要好,见图 3。在两种细胞中 PEI 的转染效果最差,可能与其毒性最大有关。

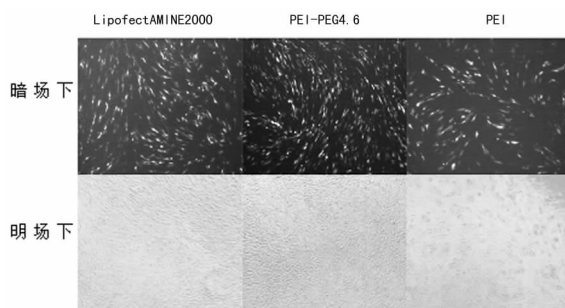


图 2 3 种基因导入系统在 C6 胶质瘤细胞中转染效率观察( $\times 100$ )

**2.3 流式细胞仪检测细胞转染效果** 为进一步明确 3 种基因导入系统在两种细胞中的转染效率,作者利用流式细胞仪检测了两种细胞中 3 种基因导入系统的转染效率,结果发现在 C6

胶质瘤细胞中 PEG-PEI 4.6 的转染效率最好,为 23.2%;LipofectAMINE2000 其次,为 16.9%;PEI 最差,为 12.6%,三者两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中则是 LipofectAMINE 2000 的转染效率最好,PEG-PEI 4.6 其次,PEI 最差,效率分别为 22.3%、17.2%、10.6%,三者两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 4。

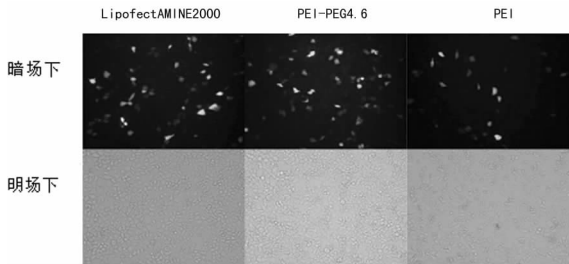


图 3 3 种基因导入系统在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中转染效率观察( $\times 100$ )

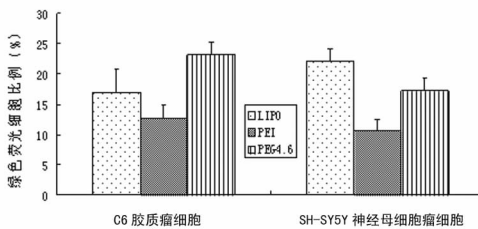


图 4 流式细胞仪检测细胞转染效果

### 3 讨论

安全高效的基因传输载体是实现基因治疗的关键之一。非病毒载体具有易于合成和改性、无免疫原性等优点使其成为基因载体的一种重要类型;但由于其具有对细胞有正电荷相关的毒性、转染效率较病毒载体低、缺乏传输特异性等缺点制约了其在临床上的应用<sup>[8-9]</sup>。

其中阳离子脂质体是磷脂和其他亲水亲组性物质分散于水中,由一层或多层同心的脂质双分子膜包封而成的超微球状载体制剂。脂质体具有的双重特性——亲水性和疏水性,决定了脂质体可以较好地包裹亲水性物质和亲脂性物质,因此,脂质体是目前运用较广泛的基因载体之一<sup>[10]</sup>。但阳离子脂质体细胞毒性相对较高,对不同的细胞可能会干扰细胞的代谢<sup>[4]</sup>。

阳离子纳米颗粒是一种直径在 1~100 nm 之间的超微粒子,具有表面效应、小尺寸效应和宏观量子隧道效应等<sup>[11]</sup>。基因转染时将基因治疗分子包裹在纳米颗粒之中或吸附在其表面,在细胞摄粒作用下,纳米颗粒进入细胞内,释放基因治疗分子,发挥其基因治疗效能<sup>[12-13]</sup>。纳米颗粒基因转移载体是目前极为有效的非病毒载体,其转染效率较传统方法高百倍<sup>[14]</sup>。

基因载体的转染效率是和纳米材料或者脂质体的细胞毒性相关的,如果复合物的毒性比较高,则相应的转染表达水平也要下降。MTT 比色法是免疫学衡量细胞增殖的经典方法,本研究采用了 MTT 实验研究了 LipofectAMINE 2000、PEI、PEG-PEI 4.6 这 3 种材料载体各自复合 pDNA 后的细胞毒性,C6 胶质瘤细胞和 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞种,PEG-PEI 4.6 的细胞存活率为 83%,比 PEI(70%)和 LipofectAMINE 2000(73%)的细胞存活率要高。说明纳米材料在改造后同样用量的时候毒性大大降低了<sup>[15]</sup>。

为了衡量转染效果,各种材料的复合物在 C6 胶质瘤细胞和 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中进行转染,分别更直观地在

荧光显微镜下观测以及流式细胞仪检测。在 C6 胶质瘤细胞中,PEG-PEI 4.6 转染的绿色荧光蛋白表达水平比 LipofectAMINE 2000 和 PEI 都高;而在 SH-SY5Y 神经母细胞瘤细胞中,LipofectAMINE 2000 的绿色荧光蛋白表达水平比另外两种载体的表达水平都高。这可能是由于细胞类型表面表达受体不同导致的<sup>[7]</sup>。流式细胞仪检测结果也证实了荧光显微镜下观测所得的结果。

由此可以得出,LipofectAMINE 2000 和 PEG-PEI 4.6 都可以作为 C6 胶质瘤细胞和 SY5Y 神经母细胞瘤细胞基因传输的载体,但由于 LipofectAMINE 2000 商品化程度比较高,而且表达相对稳定,虽然有部分毒性作用,但仍然可作为目前神经系统基因转染的传输载体。而 PEG-PEI 4.6 作为 PEI 的常见的改进品,各方面的性能都优于 PEI,具有很高的可塑性和提升空间。

### 参考文献:

- [1] Suk JS,Suh J,Lai SK,et al. Quantifying the intracellular transport of viral and nonviral gene vectors in primary neurons[J]. *Exp Biol Med*,2007,232(3): 461-469.
- [2] Lotem M,Zhao Y,Riley J,et al. Presentation of tumor antigens by dendritic cells genetically modified with viral and nonviral vectors[J]. *J Immunother*,2006,29(6): 616-627.
- [3] McMahon JM,Conroy S,Lyons M,et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors[J]. *Stem Cells Dev*,2006,15(1): 87-96.
- [4] Obata Y,Gianni C,Raffa V,et al. Evaluation of cationic liposomes composed of an amino acid-based lipid for neuronal transfection[J]. *Nanomedicine*,2010,6(1): e70-77.
- [5] Jonathan DE,Bielinska AU,Kukowska-Latallo JF,et al. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells[J]. *Pharm Sci Technol Today*,2000,3(7):232-245.
- [6] Martín-Montañez E,López-Téllez JF,Acevedo MJ,et al. Efficiency of gene transfection reagents in NG108-15,SH-SY5Y and CHO-K1 cell lines[J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*,2010,32(5):291-297.
- [7] Suk JS,Suh J,Choy K,et al. Gene delivery to differentiated neurotypic cells with RGD and HIV Tat peptide functionalized polymeric nanoparticles[J]. *Biomaterials*,2006,27(29):5143-5150.
- [8] Kealy B,Liew A,McMahon JM,et al. Comparison of viral and nonviral vectors for gene transfer to human endothelial progenitor cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*,2009,15(2):223-231.
- [9] Rejman J,De Fino I,Paroni M,et al. Impact of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* on transfection mediated by viral and nonviral vectors[J]. *Hum Gene Ther*,2010,21(3):351-356.
- [10] Chen YX,Qiao WH,Liu DL,et al. The mechanism and efficiency affecting factor of cationic liposome transfection[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*,2007,23(5): 776-780.

水平与临床不同指标之间无关。对于这一结果作者认为可能与 TNF- $\beta$  具有促肿瘤和抗肿瘤的双重作用有关。在组织中 TNF- $\beta$  表达以肿瘤细胞阳性为标准,自分泌 TNF- $\beta$  主要起促肿瘤作用,故 TNF- $\beta$  在组织中高表达提示预后差。而血浆中所测得的是总 TNF- $\beta$  水平,为肿瘤细胞自分泌和血管内皮细胞、吞噬细胞旁分泌 TNF- $\beta$  的总和,血浆 TNF- $\beta$  水平与临床不同指标的关系是二者综合作用结果,因此,血浆 TNF- $\beta$  水平对临床判断预后的意义不大。TNF- $\beta$  在不同类型淋巴瘤组织与血浆中表达无相关性,说明 TNF- $\beta$  自分泌与旁分泌作用存在复杂的机制,其表达水平存在明显的差异。

综上所述,TNF- $\beta$  在淋巴瘤组织和血浆都有不同程度表达,提示 TNF- $\beta$  在淋巴瘤发生、发展中起到一定作用,但是 TNF- $\beta$  与淋巴瘤的关系比较复杂,不同的亚型可能存在不同的机制,有必要进一步研究,探讨其详细机制。

#### 参考文献:

- [1] 赵洪云,钟雪云,陈运贤. 肿瘤坏死因子基因多态性与非霍奇金淋巴瘤临床与预后相关性研究[J]. 中国肿瘤临床,2010,37(1):23-28.
- [2] Jaffy ES, Harris NL, Stein H, et al. World Health Organization classification of tumours pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues[M]. Lyon: Iarc Press, 2008; 111-113.
- [3] 顾霞,林汉良,邵建勇,等. 不同类型淋巴瘤 Survivin 的表达及其意义[J]. 癌症,2004,23(6):655-661.
- [4] Mcdevitt H, Munson S, Ettinger R, et al. Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity[J]. Arthritis Res, 2002,4(3):141-152.
- [5] Christine F, Skibola, Paige M, et al. Tumor necrosis factor (TNF) and lymphotoxin- $\alpha$  (LTA) polymorphisms and risk of Non-Hodgkin lymphoma in the InterLymph consortium [J]. Am J Epidemiol, 2010, 171(3):267-276.
- [6] Cerhan JR, Liu-Mares W, Fredericksen ZS, et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and the nuclear factor-kappaB canonical pathway and risk of non-Hodgkin's lymphoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(11):3161-3169.
- [7] 车坤兰,罗程,何凤仪. 子宫内位症与肿瘤坏死因子 TNF $\alpha$ -308G/A 和 TNF $\beta$ G252A 基因多态性的关系[J]. 解剖学研究,2010,32(1):21-24.
- [8] 赵洪云,陈运贤. 肿瘤坏死因子基因多态性与血液系统恶性肿瘤[J]. 癌症,2003,22(2):216-220.
- [9] Saberi Hosnijeh F, Krop EJ, Scoccianti C, et al. Plasma cytokines and future risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a case-control study nested in the Italian European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(6):1577-1584.
- [10] Sappino AP, Seelentag W, Pelte MF, et al. Tumor necrosis factor/cachectin and lymphotoxin gene express patients [J]. Blood, 1990, 75(4):958-962.
- [11] 孟伟,顾霞,王富强. TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤中表达及其意义[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(4):340-346.
- [12] Zdzisińska B, Bojarska-Junak A, Dmoszyńska A, et al. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2008, 56(3):207-221.
- [13] Davies FE, Rollinson SJ, Rawstron AC, et al. High-producer haplotypes of tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are associated with an increased risk of myeloma and have an improved progression-free survival after treatment [J]. J Clin Oncol, 2000, 18(15):2843-2851.
- [14] Warzocha K, Ribeiro P, Renard N, et al. Expression of genes coding for the tumor necrosis factor and lymphotoxin ligand-receptor system in non-Hodgkin's lymphomas[J]. Cancer Immunol Immunother, 2000, 49(9):469-475.
- [15] Nagy B, Ferrer A, Larramendy ML, et al. Lymphotoxin beta expression is high in chronic lymphocytic leukemia but low in small lymphocytic lymphoma: a quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis[J]. Haematologica, 2003, 88(6):654-658.
- [16] Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: non-Hodgkin's lymphomas[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(3):288-334.

(收稿日期:2011-03-17 修回日期:2011-12-21)

(上接第 1794 页)

- [11] Ravi Kumar M, Hellermann G, Lockey RF, et al. Nanoparticle-mediated gene delivery: state of the art[J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4(8):1213-1224.
- [12] Bozkir A, Saka OM. Chitosan-DNA nanoparticles: effect on DNA integrity, bacterial transformation and transfection efficiency[J]. J Drug Target, 2004, 12(5):281-288.
- [13] Salah-Eddine S, Holger F, Haag R. Dendritic polymers in biomedical applications: From potential to clinical use in diagnostics and therapy[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2002, 41(8):1329-1334.
- [14] Kumar A, Yellepeddi VK, Davies GE, et al. Enhanced gene transfection efficiency by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers modified with ornithine residues[J]. Int J Pharm, 2010, 392(1/2):294-303.
- [15] Liang B, He ML, Xiao ZP, et al. Synthesis and characterization of folate-PEG-grafted-hyperbranched-PEI for tumor-targeted gene delivery [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 367(4):874-880.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-04-22)